



Jimena García Rodríguez

**Anatomia associada ao
comportamento reprodutivo de
Cubozoa**

**Anatomy associated with the
reproductive behavior of
Cubozoa**

São Paulo

2015

Jimena García Rodríguez

**Anatomia associada ao
comportamento reprodutivo de
Cubozoa**

**Anatomy associated with the
reproductive behavior of
Cubozoa**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo para
obtenção de Título de Mestre em Ciências, na
Área de Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Marques

São Paulo

2015

García Rodríguez, Jimena

Anatomia associada ao comportamento reprodutivo de
Cubozoa

96 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo.
Departamento de Zoologia.

1. Cubozoa; 2. Histologia; 3. Reprodução.

I. Universidade de São Paulo. Instituto de
Biociências. Departamento de Zoologia.

Comissão Julgadora

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof. Dr. Antonio Carlos Marques

A mis padres, hermana y
en especial a mi abuelita

“Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.
Caminante no hay camino
sino estelas en la mar”

Antonio Machado, 1912

Agradecimentos

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer ao meu orientador Antonio Carlos Marques, Tim, pela confiança desde o primeiro dia, pela ajuda tanto pessoal como profissional durante os dois anos de mestrado, pelas discussões de cada tema tratado e estudado e pelas orientações que tornaram possível a elaboração deste trabalho.

Agradeço também o apoio institucional do Instituto de Biociências e do Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo.

Obrigada ao CNPq, pela bolsa (Processo: 134663/2013-6) proporcionada durante o Mestrado.

Gostaria de agradecer também a todos os docentes que formaram parte deste estudo, em especial ao professor José Eduardo Marian, por me ensinar toda a histologia (que agora começo a entender) e pela paciência desde o começo. Obrigada também ao professor André C. Morandini por todo o material emprestado, por resolver muitas dúvidas e por me ajudar a compreender um pouco mais das Cubos. Obrigada também ao professor Alvaro Migotto pelas fantásticas imagens cedidas e aos doutores Allen Collins (National Museum of Natural History, Smithsonian Institution) e Sho Toshino pelos materiais fornecidos.

Infinitos agradecimentos à nossa colaboradora (e amiga) Cheryl Lewis Ames por sua estadia no Brasil, por me atender sempre que necessário e pelas grandes descobertas.

Obrigada aos técnicos Phillip Lenktaitis e Ênio Mattos pelo tempo que compartilhamos no grande laboratório de histologia e pelas dicas e risadas nos momentos mais frustrantes. Eu gostaria de agradecer também aos técnicos do CEBIMarpor todo seu apoio.

Muito obrigada aos colegas e, sobretudo, amigos de laboratório (LEM), María Mendoza, Amanda Cunha, Karla Paresque, Lucília Miranda, Thaís Miranda, Marina Fernández, Fernanda Miyamura, Adrián Jaimes e Adriana Morales. Obrigada pelo trabalho em equipe que tanto ajuda, pelas discussões, pelas dicas, pelos ânimos, por me escutar e por me fazer sentir em casa. Obrigada por ser a minha família aqui. Obrigada também a Melissa J. Acevedo pela estância na USP, pela paciência, por me transmitir as boas vibrações e por me ensinar tudo o que sabia.

Obrigada também a meus amigos fora do laboratório, em especial a Karina, Isabel e a Nilvea pelo apoio, muito obrigada por estar perto.

Obrigado aos meus amigos que não estão aqui, mas que mesmo à distância me apoiaram sempre e me fizeram sentir como se estivessem por perto. Obrigado à Lola, Olim, Ángel, Ser, Sara, Ainhoa, Vir e Laura.

Muito obrigada à toda a família Bressiani por cuidar de mim, por me fazer sentir como parte da família e por ser minha família aqui. Sem eles este trabalho não teria sido possível. Obrigado ao Paulo por ser meu melhor amigo e companheiro, pelo grande apoio, pelos conselhos e discussões, por toda confiança, por ajudar-me e dar-me forças para seguir com este trabalho e por haver estado sempre ao meu lado.

Finalmente, gostaria de agradecer a minha família, sempre presente me animando e aconselhando-me, especialmente aos meus pais por ter confiado em mim e ter me deixado voar.

Gracias a todos de corazón.

Índice

CAPÍTULO 1. Introdução.....	1
A classe Cubozoa	1
Reprodução sexuada dos Cubozoa	2
Espécies estudadas.....	2
Objetivos do trabalho.....	4
Organização da Dissertação	4
Referências.....	5
Figuras	10
CAPÍTULO 2. Histology of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa) gonads reveals variation among internal fertilizing species <i>Alatina alata</i> (Alatinidae) and <i>Copula sivickisi</i> (Tripedaliidae) (García-Rodríguez J., C. Lewis, J. E. A. R. Marian, & A. C. Marques. A ser submetido)	11
Abstract	11
Resumo.....	12
Introduction	12
Material and methods.....	14
Results	16
Discussion.....	19
References.....	26
Figures	30
Tables	47
CAPÍTULO 3. Equivocal evolution in testes' organization of cubozoans (Cnidaria) (García-Rodríguez J., C. Lewis, J. E. A. R. Marian, & A. C. Marques. A ser submetido)	49
Abstract	49
Resumo.....	50
Introduction	51
Material and methods.....	52
Results	53
Discussion.....	55
References.....	58
Figures	61
Tables	68
CAPÍTULO 4. Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan (Marques, A. C., J. García, & C. Lewis Ames, 2015. Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan. Trends in Ecology & Evolution)	72
References.....	74
Figures	76
CAPÍTULO 5. Considerações Finais.....	77
Referências.....	78
Resumo	80
Abstract	81
APÊNDICE I Protocolo para inclusão em historresina.	82
APÊNDICE II Métodos De Coloração (Historresina)	83
APÊNDICE III Preparação Dos Corantes (Fórmulas Para Preparar 300 ml).....	86

CAPÍTULO 1.

Introdução

A classe Cubozoa

O filo Cnidaria é formado por dois clados, Anthozoa e Medusozoa (Werner, 1973a; Bridge *et al.*, 1995; Marques & Collins, 2004), este diferenciado por ter DNA mitocondrial linear e fase de medusa no ciclo de vida. O subfilo Medusozoa, por sua vez, compreende quatro classes, Staurozoa, Hydrozoa, Scyphozoa e Cubozoa, distintas especialmente pelos ciclos de vida (Marques & Collins, 2004) (Figura 1).

Nosso modelo de estudo foi Cubozoa, com cerca de 50 espécies descritas (Bentlage *et al.*, 2010) distribuídas por zonas costeiras ou neríticas, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Werner, 1973a). Os cubozoários, conhecidos em inglês como “box jellyfish”, eram considerados parte dos Scyphozoa até serem elevados à classe (Werner, 1973a; 1975) com base nas diferenças que existem no ciclo de vida e na morfologia de seu pólipó. Esta proposta foi corroborada também com base em estudos com nematocistos (Calder & Peters, 1975), microanatomia do pólipó (Chapman, 1978), comportamento (Hartwick, 1991; Stewart, 1996; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Garm *et al.*, 2012) e inferências moleculares (Collins, 2002; Marques & Collins, 2004; Collins *et al.*, 2006; Bentlage *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2012).

Algumas das características únicas de Cubozoa são a medusa em forma cúbica, metamorfose completa do pólipó em medusa, velário (uma dobra da subumbrela, semelhante em função ao véu das hidromedusas, com canais gastrovasculares) e pedálio (extensão da borda inferior da umbrela em cada aresta e que dá origem aos tentáculos) na medusa, quatro ropálios com estruturas sensoriais (estatocisto e olhos simples e complexos) em cada face da umbrela (Marques & Collins, 2004), além de toxinas potentes, como por exemplo, em *Chironex fleckeri* (Chirodripidae), considerada como “o animal mais venenoso da Terra” (Endean, 1988).

A classe Cubozoa é monofilética (Kim *et al.*, 1999; Collins, 2002; Marques & Collins, 2004) e formada por duas ordens, também monofiléticas, Chirodripida e Carybdeida (Collins *et al.*, 2006; Collins, 2009; Bentlage *et al.*, 2010). Estas ordens são diferenciadas por características da medusa, como o número de tentáculos por pedálio (um em Carybdeida, mais de um em Chirodripida), morfologia do pedálio (simples em Carybdeida e geralmente ramificado em Chirodripida) e sáculos gástricos (estruturas subumbrelares digitiformes lisas presentes em Chirodripida) (Gershwin, 2005a). Atualmente se considera Carybdeida divididos

em cinco famílias, Carybdeidae, Tripedaliidae, Tamoyidae, Carukiidae e Alatinidae; e Chirodropida com três famílias, Chirodropidae, Chiropsalmidae e Chiropsellidae (Gershwin, 2006; Bentlage *et al.*, 2010; Bentlage & Lewis, 2012; Toshino *et al.*, 2015) (Figura 2).

Reprodução sexuada dos Cubozoa

A literatura referente à reprodução sexuada em Cubozoa é escassa. Suas gônadas têm origem endodérmica (Hyman, 1940; Widersten, 1965; Campbell, 1974; Miller, 1983; Marques & Collins, 2004; Bentlage *et al.*, 2010). A medusa adulta é gonocórica, em alguns casos com dimorfismo sexual da morfologia gonadal (e.g. *Copula sivickisi* em Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Straehler-Pohl *et al.*, 2014; Toshino *et al.*, 2014; Garm *et al.*, 2015; *Tripedalia cystophora* em Werner, 1973b; Straehler-Pohl *et al.*, 2014).

A fertilização em Cubozoa pode ser externa ou interna. Fertilização externa é considerada distintiva de Chirodropida, a partir do conhecimento que existe para as espécies *Chironex fleckeri* e *Chiropsella bronzie* (Yamaguchi & Hartwick, 1980), sendo a fertilização interna considerada sinapomorfia de Carybdeida (Bentlage *et al.*, 2010). Não há estudos sobre a reprodução para espécies de Tamoyidae, mas a fertilização externa para Carukiidae *Morbakka virulenta* põe em dúvida a fertilização interna como característica universal de Carybdeida. Tripedaliidae, por sua parte, apresenta características diferentes, em que os machos produzem espermatóforos que são transferidos para a fêmea por meio de um comportamento de corte, ocorrendo fertilização interna (Werner, 1973a, 1973b; Stewart, 1996; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Hartwick, 1991; Garm *et al.*, 2015).

Espécies estudadas

Neste estudo foram analisadas histologicamente as gônadas de seis espécies de famílias diferentes, cinco da ordem Carybdeida (*Alatina alata*, *Carybdea marsupialis*, *Copula sivickisi*, *Morbakka virulenta* e *Tamoya haplonema*) e uma Chirodropida (*Chiropsalmus quadrumanus*). Segue uma breve exposição das espécies:

Alatina alata (Reynaud 1830), Alatinidae: originalmente descrita como *Carybdea alata* (Arneson & Cutress, 1976; ver Gershwin, 2005b para lista de citações), tem umbrela até 80 mm de altura e 40 mm de largura. Mais comum em águas rasas do Atlântico Ocidental (incluindo Golfo do México e Mar do Caribe), possui também registros em águas mais profundas do Oceano Atlântico (Morandini, 2003; Lewis *et al.*, 2013). Há registros de reprodução mensal em Bonaire (Holanda) em agregações noturnas cerca de 7-10 dias após luas cheias (Lewis *et al.*, 2013). Possui fertilização interna, com blástula liberada após algumas horas pela fêmea

(Arneson & Cutress, 1976; Lewis *et al.*, 2013). Os espécimes analisados são de Bonaire, depositados na coleção do National Museum of Natural History (NMNH), Washington DC, USA.

Carybdea marsupialis (Linnaeus, 1758), Carybdeidae: primeira espécie de Cubozoa descrita, com umbrela da medusa com até 40 mm de altura e 30 mm de largura. Atualmente tem registros no Mar Caribe, ao longo das costas africanas e portuguesas, e no Mar Mediterrâneo (Studebaker, 1972; Cutress, 1972; Corbelli *et al.*, 2003; Di Camillo *et al.*, 2006; Bordehore *et al.*, 2011). Sua fertilização interna ocorre dentro da cavidade gastrovascular da fêmea (Studebaker, 1972). O material analisado prove do Mar Mediterrâneo, depositado na coleção do NMNH e do LIFE+ CUBOMED Project.

Copula sivickisi (Stiasny, 1926), Tripedaliidae: classificada anteriormente como *Carybdea sivickisi*, é a menor espécie de Cubozoa descrita, com uma umbrela até 12 mm de altura e 14 mm de diâmetro. Distribuída em algumas áreas tropicais dos oceanos Pacífico e Atlântico (Stiasny, 1922, 1926; Uchida, 1929; Hoverd, 1985; Hartwick, 1991; Matsumoto *et al.*, 2002; Lewis & Long, 2005; Crow *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2013), apresenta dimorfismo sexual nas gônadas. Seus machos produzem espermatóforo que transferem para as fêmeas em um comportamento de corte. Sua fertilização é interna e a fêmea libera uma cadeia de embriões (“embryo strand”) na coluna de água (Hartwick, 1991; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Toshino *et al.*, 2014; Garm *et al.*, 2015). Os espécimes que estudamos provêm de diferentes localidades do Japão e estão depositados no NMNH.

Morbakka virulenta (Kishinouye, 1910), Carukiidae: umbrela pode alcançar 200 mm de altura. Ocorrem em Okayama (Japão) (Toshino *et al.*, 2013), possui fertilização externa (cf. Toshino *et al.*, 2013), embora esse mesmo estudo descreva a liberação de “ovos fertilizados” por parte da fêmea.

Tamoya haplonema F. Müller, 1859, Tamoyidae: umbrela chega até 150 mm de altura e 60 mm de largura. Distribui-se pela costa atlântica das Américas, com registros desde Argentina até o estado de New Jersey (EUA), bem como Congo, Guiné, África do sul e corrente de Benguela (Müller, 1859; Vannucci, 1957; Mianzan & Cornelius, 1999; Pastorino, 2001). Sua reprodução ainda não foi descrita. Os espécimes estudados provêm do Canal de São Sebastião (litoral de São Paulo) e do estado de New Jersey (EUA).

Chiropsalmus quadrumanus (F. Müller, 1859), Chiropsalmidae: única representante de Chirodropida neste estudo, sua umbrela alcança 100 mm de altura e 140 mm de largura. Tem distribuição desde o Sul do Brasil até a Carolina do Norte, EUA (Vannucci, 1954; Calder & Peters,

1975; Morandini *et al.*, 2005; Gershwin, 2006). Sua reprodução não foi descrita, mas pode se esperar que sua fertilização seja externa se seguida a universalização do caráter sugerida para Chirodropida (Bentlage *et al.*, 2010). Os espécimes estudados provêm do Canal de São Sebastião (litoral de São Paulo) e do estado de Carolina do Norte (EUA).

Objetivos do trabalho

As análises morfológicas e histológicas, contrastadas aos dados comportamentais, foram usadas com o objetivo de (a) inferir um padrão geral na morfologia gonadal em relação ao tipo de fertilização; (b) estabelecer as relações da diversidade de modos de reprodução e morfologias associadas com a filogenia do grupo; (c) definir estruturas pós-espermáticas (os pacotes de esperma: espermatóforo e espermatózeugma) para Cubozoa Carybdeida; (d) inferir processos da utilização de estruturas de armazenamento de esperma (vesícula seminal em machos e espermateca em fêmeas), bem como dos sacos subgástricos presentes em Tripedaliidae.

Organização da Dissertação

Esta tese está organizada em cinco capítulos, sendo o primeiro esta introdução, que expõe as características principais do estudo, seus objetivos e sua organização

O capítulo dois, “Histology of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa) gonads reveals variation among internal fertilizing species *Alatina alata* (Alatinidae) and *Copula sivickisi* (Tripedaliidae)”, tem como objetivo usar os dados comparados da histomorfologia das gônadas das espécies *Alatina alata* (Alatinidae) e *Copula sivickisi* (Tripedaliidae) para elucidar processos de fertilização interna com diferentes nuances de transferência de esperma em Cubozoa. Nele descrevemos as estruturas pós-espermáticas espermatóforo e espermatózeugma, presentes nos Carybdeida, conceituando o espermatózeugma em *A. alata* como um modo de transferência de esperma em pacotes desprovidos de membrana. Além disso, detalhamos diferentes estruturas de *C. sivickisi* importantes na reprodução, como os sacos subgástricos e as manchas velariais (presentes nas fêmeas).

O capítulo três, “Equivocal evolution in testes’ organization of cubozoans (Cnidaria)”, traz a primeira descrição histológica comparada da morfologia gonadal de machos e a espermatogênese de quatro espécies de Cubozoa. As espécies estudadas têm diferentes estratégias reprodutivas, de modo que o objetivo desse estudo foi inferir se a estrutura das gônadas masculinas possuem um padrão morfológico relacionado ao tipo de fertilização ou à filogenia.

O capítulo quatro, “Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan”, é um ensaio relacionado ao artigo “Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria” (Orr & Brennan, 2015), com o objetivo de suplementar suas informações com organismos filogeneticamente basais no reino animal, e com hábito planctônico, como as cubomedusas, mas que também apresentam fertilização interna e estruturas de armazenamento de esperma.

O capítulo cinco apresenta as considerações finais do estudo e indica possíveis desdobramentos para essa área de estudo, como a inclusão de dados sobre mais espécies de Cubozoa e um aumento de conhecimento relacionado às fêmeas que, permitirá abordar questões levantadas ao final desse estudo.

Referências

- Arneson, A. C., & C. E. Cutress, 1976. Life History of *Carybdea alata* Reynaud, 1830 (Cubomedusae). *Coelenterate Ecology and Behavior* 227–236.
- Bennett, C. L., M. D. Nicholson, & R. B. Erdman, 2013. First record of *Copula sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa) in the tropical western Atlantic Ocean: An enigmatic occurrence from San Salvador Island, Bahamas. *Proceedings of the 14th Symposium on the Natural History of the Bahamas* (eds Tepper C, Shaklee R). Gerace Research Center, San Salvador, Bahamas 33-37.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A. A. Yanagihara, C. Lewis, G. S. Richards, & A. G. Collins, 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 493–501.
- Bentlage, B., & C. Lewis, 2012. An illustrated key and synopsis of the families and genera of carybdeid box jellyfishes (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida), with emphasis on the “Irukandji family” (Carukiidae). *Journal of Natural History* 46(41-42): 2595–2620.
- Bordehore, C., V. L. Fuentes, D. Atienza, C. Barberá, D. Fernandez-Jover, M. Roig, M. J. Acevedo-Dudley, A. J. Canepa, & J. M. Gili, 2011. Detection of an unusual presence of the cubozoan *Carybdea marsupialis* at shallow beaches located near Denia, Spain (south-western Mediterranean). *Marine Biodiversity Records* 4: e69.
- Bridge, D., C. W. Cunningham, R. DeSalle, & L. W. Buss, 1995. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: molecular and morphological evidence. *Molecular biology and evolution* 12(4): 679–689.
- Calder, D. R., & E. C. Peters, 1975. Nematocysts of *Chiropsalmus quadrumanus* with comments on the systematic status of the Cubomedusae. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 27(3): 364–369.
- Campbell, R. D., 1974. Cnidaria. *Reproduction of Marine invertebrates* 1: 133–199.

- Chapman, D. M., 1978. Microanatomy of the cubopolyp, *Tripedalia cystophora* (Class Cubozoa). *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 31(1-2): 128–168.
- Collins, A. G., 2002. Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *Journal of Evolutionary Biology* 15(3): 418–432.
- Collins, A. G., P. Schuchert, A. C. Marques, T. Jankowski, M. Medina, & B. Schierwater, 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55(1): 97–115.
- Collins, A. G., 2009. Recent insights into cnidarian phylogeny. *Smithsonian Contributions to the Marine Sciences* 38: 139–149.
- Corbelli, A., M. Avian, R. Marotta, & M. Ferraguti, 2003. The spermatozoon of *Carybdea marsupialis*. *Invertebrate Reproduction and Development* 43(2): 95–104.
- Crow, G. L., A. Miroz, N. Chan, & K. Lam, 2006. Documentation of box jellyfish *Carybdea sivickisi* and *Carybdea rastoni* (Cubozoa: Carybdeidae) at Ma'alaea Harbor, Maui. *Bishop Museum Occasional Papers* 88: 55–56.
- Cutress, C. E., 1972. Investigation of the biology and control of noxious Coelenterates occurring in the coastal waters of Puerto Rico.
- Di Camillo, C., M. Bo, S. Puce, S. Tazioli, & G. Bavestrello, 2006. The cnidome of *Carybdea marsupialis* (Cnidaria: Cubomedusae) from the Adriatic Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(04): 705-709.
- Endean, R., 1988. *Venom of Chironex, the world's most venomous animal. Venoms and Victims*. South Brisbane: The Queensland Museum and Amphiom Press 15-24.
- Garm, A., J. Bielecki, R. Petie, & D. E. Nilsson, 2012. Opposite patterns of diurnal activity in the box jellyfish *Tripedalia cystophora* and *Copula sivickisi*. *The Biological Bulletin* 222(1): 35–45.
- Garm, A., M. Lebouvier, & D. Tolunay, 2015. Mating in the box jellyfish *Copula sivickisi* -Novel function of cnidocytes. *Journal of Morphology* 276(9): 1055-1064.
- Gershwin, L. A., 2005a. Taxonomy and phylogeny of Australian Cubozoa. Doctoral Dissertation, James Cook University.
- Gershwin, L. A., 2005b. *Carybdea alata* auct. and *Manokia Stiasnyi*, reclassification to a new family with description of a new genus and two new species. *Memoirs of the Queensland Museum* 51: 501–523.
- Gershwin, L. A., 2006. Comments on *Chiropsalmus* (Cnidaria: Cubozoa: Chiropodida): A preliminary revision of the Chiropsalmidae, with descriptions of two new genera and two new species. *Zootaxa* 1231: 1–42.
- Hartwick, R. F., 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia* 216-217: 171–179.

- Hoverd, W. A., 1985. Occurrence of the order Cubomedusae (Cnidaria: Scyphozoa) in New Zealand: collection and laboratory observations of *Carybdea sivickisi*. New Zealand Journal of Zoology 12(1): 107–110.
- Hyman, L. H., 1940. The Invertebrates: Vol. 1, Protozoa through Ctenophora. McGraw-Hill.
- Kim, J., W. Kim, & C. W. Cunningham, 1999. A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences. Molecular Biology and Evolution 16: 423–427.
- Lewis, C., & T. A. F. Long, 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). Marine Biology 147(2): 477–483.
- Lewis, C., S. Kubota, A. E. Migotto, & A. G. Collins, 2008. Sexually dimorphic Cubomedusa *Carybdea sivickisi* in Seto, Wakayama, Japan. Publications of the Seto Marine Biological Laboratory 40: 1–8.
- Lewis, C., B. Bentlage, A. A. Yanagihara, W. Gillan, J. Van Blerk, D. P. Keil, A. E. Bely, & A. G. Collins, 2013. Redescription of *Alatina alata* (Reynaud, 1830) (Cnidaria: Cubozoa) from Bonaire, Dutch Caribbean. Zootaxa 3737(4): 473–487.
- Marques, A. C., & A. G. Collins, 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. Invertebrate Biology 123: 23–42.
- Matsumoto, G., G. L. Crow, P. F. S. Cornelius, & B. A. Carlson, 2002. Discovery of the cubomedusa *Carybdea sivickisi* (Cubozoa: Carybdeidae) in the Hawaiian Islands. Bishop Museum Occasional Papers 69: 44–46.
- Mianzan, H. W., & P. F. S. Cornelius, 1999. Cubomedusae and Scyphomedusae. South Atlantic Zooplankton. D. Boltovskoy. Buenos Aires, SPB Academic Publishing BV, Netherlands 1, 513–559.
- Miller, R. L., 1983. Cnidaria. Reproductive Biology of Invertebrates 2: 23–73.
- Morandini, A. C., 2003. Deep-Sea medusae (Cnidaria: Cubozoa, Hydrozoa and Scyphozoa) from the coast of Bahia (western South Atlantic, Brazil). Mitteilungen aus den Hamburgischen Zoologischen Museum und Institut 100: 3–25.
- Morandini, A. C., D. Ascher, S. N. Stampar, & J. F. V. Ferreira, 2005. Cubozoa e Scyphozoa (Cnidaria: Medusozoa) de águas costeiras do Brasil. Iheringia. Série Zoologia 95(3): 281–294.
- Müller, F., 1859. Zwei neue Quallen von Santa Catharina. *Tamoya haplonema* und *quadrumana*. Abhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Halle 5: 1–12.
- Orr, T. J., & P. L. R. Brennan, 2015. Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. Trends in Ecology & Evolution Elsevier Ltd 30(5): 261–272.
- Pastorino, G., 2001. New record of the Cubomedusa *Tamoya haplonema* Müller, 1859 (Cnidaria: Scyphozoa) in the South Atlantic. Bulletin of Marine Science 68(2): 357–360.

- Smith, D. R., E. Kayal, A. A. Yanagihara, A. G. Collins, S. Pirro, & P. J. Keeling, 2012. First complete mitochondrial genome sequence from a box jellyfish reveals a highly fragmented linear architecture and insights into telomere evolution. *Genome Biology and Evolution* 4(1): 52–58.
- Stewart, S., 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 175–188.
- Stiasny, G., 1922. Papers from Dr. Th. Mortensen's Pacific Expedition 1914-1916. XII Die Scyphomedusen- Sammlung von Dr. Th. Mortensen nebst anderen Medusen aus dem Zoologischen Museum der Universität in Kopenhagen. Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i Kobenhavn Videnskabelige Meddelelser fra Dansk Naturhistorisk Forening i K0benhavn 73: 513–558.
- Stiasny, G., 1926. Über einige Scyphomedusen von Puerto Galera, Mindoro (Philippinen). *Zoologische Mededeelingen Deel. Leiden* 9: 239–248.
- Straehler-Pohl, I., A. Garm, & A. C. Morandini, 2014. Sexual dimorphism in Tripedaliidae (Conant 1897) (Cnidaria, Cubozoa, Carybdeida). *Zootaxa* 3785(4): 533–549.
- Studebaker, J. P., 1972. Development of the Cubomedusa, *Carybdea marsupialis*. Department Marine Science. Mayaguez, University of Puerto Rico.
- Toshino, S., M. Hiroshi, S. Ohtsuka, K. Okuizumi, A. Adachi, Y. Hamatsu, M. Urata, K. Nakaguchi, & S. Yamaguchi, 2013. Development and polyp formation of the giant box jellyfish *Morbakka virulenta* (Kishinouye, 1910) (Cnidaria : Cubozoa) collected from the Seto Inland Sea , western Japan. *Plankton and Benthos Research* 8(1): 1–8.
- Toshino, S., H. Miyake, & S. Iwanaga, 2014. Development of *Copula sivickisi* (Stiasny, 1926) (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae: Tripedaliidae) collected from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Plankton and Benthos Research* 9(1): 32–41.
- Toshino, S., H. Miyake, & H. Shibata, 2015. *Meteorona kishinouyei*, a new family, genus and species (Cnidaria, Cubozoa, Chirodropida) from Japanese Waters. *ZooKeys* 503: 121
- Uchida, T., 1929. Studies on the Stauromedusae and Cubomedusae, with special reference to their metamorphosis. *Japanese Journal of Morphology* 2(2): 103–193.
- Van Iten, H., A. C. Marques, J. D. M. Leme, M. L. Pacheco, & M. G. Simoes, 2014. Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: major developments in the analysis of the taxon's Proterozoic–Cambrian history. *Palaeontology*, 57(4), 677-690.
- Vannucci, M., 1954. Hydrozoa e Scyphozoa existentes no Instituto Oceanográfico II. *Boletim do Instituto Oceanográfico* 5(1-2): 95–149.
- Vannucci, M., 1957. Distribuição de Scyphozoa nas Costas do Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 29: 593–598.
- Werner, B., 1973a. New Investigations on systematics and evolution of the class Scyphozoa and the phylum Cnidaria. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 20: 35–61.

Werner, B., 1973b. Spermatozeugmen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Marine Biology* 18(3): 212–217.

Werner, B., 1975. Bau und Lebensgeschichte des Polypen von *Tripedalia cystophora* (Cubozoa, class. no., Carybdeidae) und seine Bedeutung für die Evolution der Cnidaria. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 27(4): 461–504.

Widersten, B., 1965. Genital organs and fertilization some Scyphozoa. *Zoological Institute, Uppsala* 37: 45–61.

Yamaguchi, M., & R. Hartwick, 1980. Early life history of the sea wasp *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). *Development and cellular biology of coelenterates* 11-16.

Figuras

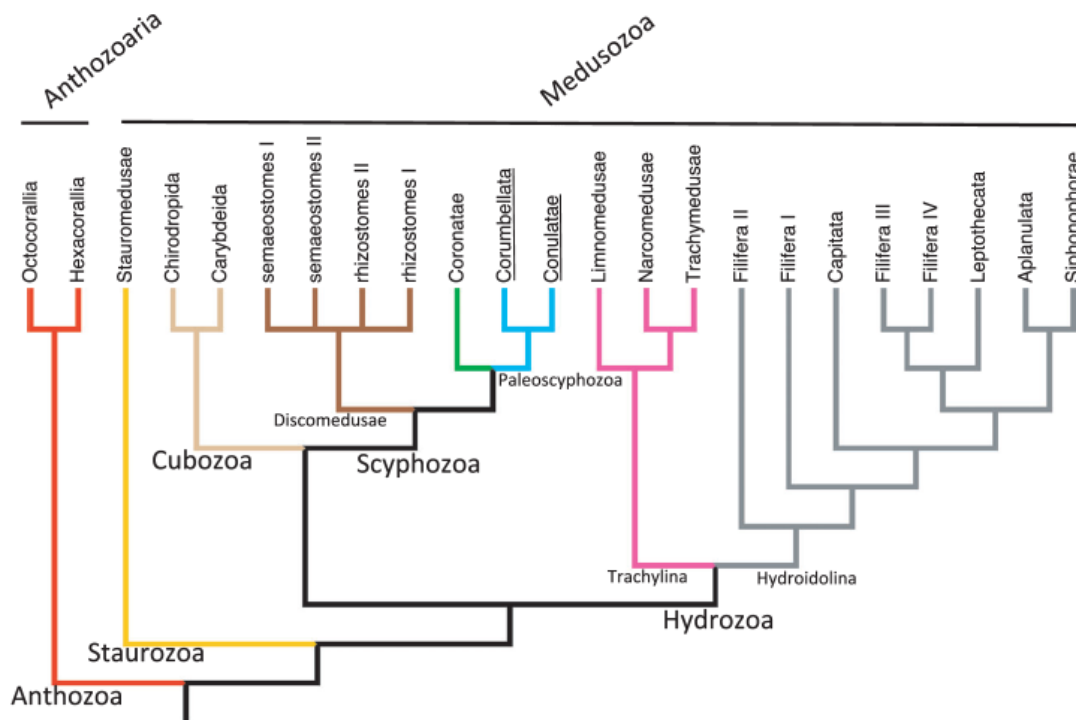


Figura 1. Hipóteses filogenética entre os Cnidaria, segundo Van Iten *et al.* (2014).

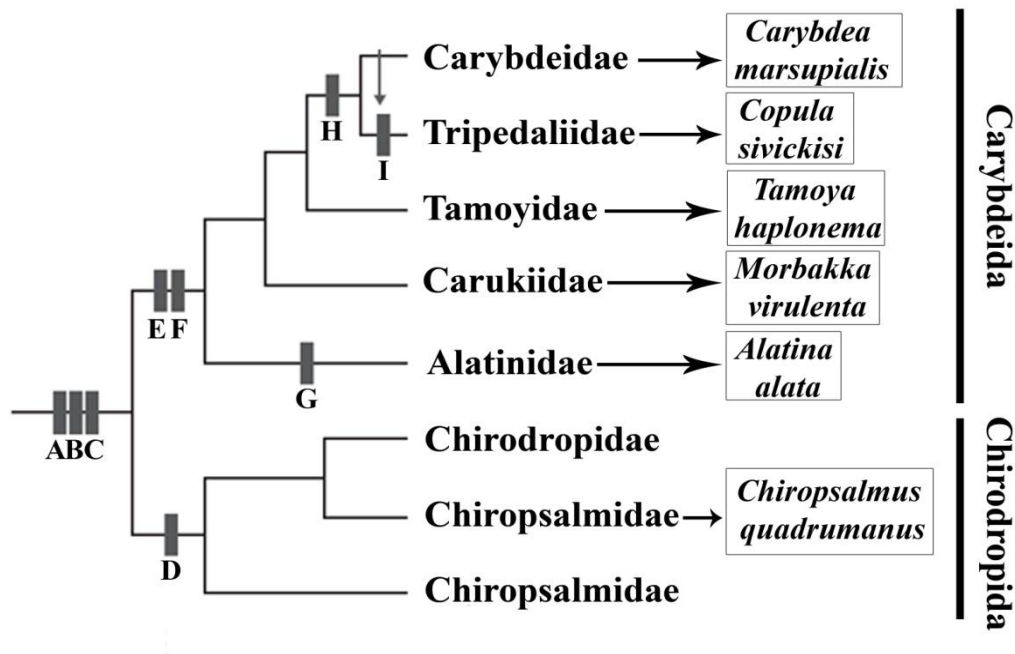


Figura 2. Espécies analisadas neste trabalho inseridas na hipótese filogenética, simplificada no nível de famílias e ordens dos Cubozoa (Bentlage *et al.*, 2010). As características, segundo o trabalho original, seriam: A- nerítico, B- modo de reprodução desconhecido, C- toxina(s) única(s), D- fertilização externa, E- ovoviviparidade, F- síndrome de Irukandji, G- pelágico, H- perda da síndrome de Irukandji, I- comportamento reprodutivo.

References

- Arneson, A. C., 1976. Life History of *Carybdea alata* Reynaud, 1830 (Cubomedusae).
- Arneson, A. C., & C. E. Cutress, 1976. Life history of *Carybdea* Reynaud, 1830 (Cubomedusae). In Mackie, G. O. (Ed.), *Coelenterate Ecology and Behavior*. New York, NY: 227–236.
- Avian, M., & L. R. Sandrini, 1991. Oocyte development in four species of Scyphomedusa in the northern Adriatic Sea. *Hydrobiologia* 216(1): 189–195.
- Avian, M., P. Bonivento, G. Montanari, A. Rinaldi, & L. Rottini Sandrini, 1993. *Carybdea marsupialis* L. (Cubozoa), istologia delle gonadi. *Biologia Marina, Suppl. Notiz. SIBM*, 1: 75–78.
- Behmer, O. A., E. M. C., de Tolosa, & A. G. de Freitas Neto, 1976). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo Livraria Editora.
- Bennett, C. L., M. D. Nicholson, & R. B. Erdman, 2013. First record of *Copula sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa) in the tropical western Atlantic Ocean: An enigmatic occurrence from San Salvador Island, Bahamas. *Proceedings of the 14th Symposium on the Natural History of the Bahamas* (eds Tepper C, Shaklee R). Gerace Research Center, San Salvador, Bahamas 33-37.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A. A. Yanagihara, C. Lewis, G. S. Richards, & A. G. Collins, 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 493–501.
- Bancroft, J., & A. Stevens, 1982. *Theory and practice of histological techniques*. Londres: Churchill Livingstone.
- Cartwright, P., & A. M. Nawrocki, 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and comparative biology* 50(3): 456–472.
- Coates, M., S. Thompson, & D. E. Nilsson, 2001. The image forming capabilities of the camera-type eyes of a box jellyfish, *Tripedalia cystophora*. *American Zoologist* 41:1640.
- Corbelli, A., M. Avian, R. Marotta, & M. Ferraguti, 2003. The spermatozoon of *Carybdea marsupialis*. *Invertebrate Reproduction and Development* 43(2): 95–104.
- David, C. N., & D. Challoner, 1974. Distribution of interstitial cells and differentiating nematocytes in nests in *Hydra attenuata*. *Integrative and Comparative Biology* 14(2): 537–542.
- Eckelbarger, K. J., & R. L. Larson, 1988. Ovarian morphology and oogenesis in *Aurelia aurita* (Scyphozoa: Semaestomae): ultrastructural evidence of heterosynthetic yolk formation in a primitive metazoan. *Marine Biology* 100(1): 103–115.
- Eckelbarger, K. J., & R. J. Larson, 1993. Ultrastructural Study of the Ovary of the Sessile Scyphozoan, *Haliclystus octoradiatus* (Cnidaria, Stauromedusae). *Journal of Morphology* 218(2): 225–236.

- Eckelbarger, K. J., 1994. Oocytic nutrition in the lower Metazoa: The Scyphozoa. *Reproduction and Development of Marine Invertebrates* 15–28.
- Falese, L. E., M. P. Russell, & N. R. Dollahon, 2011. Spermcasting of spermatozeugmata by the bivalves *Nutricula confusa* and *N. tantilla*. *Invertebrate Biology* 130(4): 334–343.
- Franzén, Å., 1996. Ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in the hydrozoan *Cordylophora caspia* with comments on structure and evolution of the sperm in the Cnidaria and the Porifera. *Invertebrate Reproduction and Development*, 29(1), 19-26.
- Garm, A., M. Lebouvier, & D. Tolunay, 2015. Mating in the box jellyfish *Copula sivickisi* -Novel function of cnidocytes. *Journal of Morphology* 276(9): 1055-1064.
- Gershwin, L. A., 2005. Taxonomy and phylogeny of Australian Cubozoa. Doctoral Dissertation, James Cook University.
- Hadfield, M. G., & C. N. Hopper, 1980. Ecological and evolutionary significance of pelagic spermatophores of vermetid gastropods. *Marine Biology* 57(4): 315–325.
- Hartwick, R. F., 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia* 216-217: 171–179.
- Hinsch, G. W., & W. H. Clark, 1973. Comparative fine structure of Cnidaria spermatozoa. *Biology of reproduction* 8(1): 62–73.
- Hoving, H. J. T., & V. Laptikhovskiy, 2007. Getting under the skin: Autonomous implantation of squid spermatophores. *Biological Bulletin* 212(3): 177–179.
- Humason, G. L., 1962. Animal tissue techniques. San Francisco: W. H. Freeman and Company
- Iguchi, N., H. E. Lee, W. D. Yoon, & S. Kim, 2010. Reproduction of the giant jellyfish, *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae), in 2006-2008 as peripherally-transported populations. *Ocean Science Journal* 45(2): 129–138.
- Junqueira, L. C., 1995. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciência e Cultura* 47: 92–95.
- Kotrba, M., 1996. Sperm transfer by spermatophore in Diptera: New results from the Diopsidae. *Zoological Journal of the Linnean Society* 117(3): 305–323.
- Lewis, C., & T. A. F. Long, 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine Biology* 147(2): 477–483.
- Lewis, C., S. Kubota, A. E. Migotto, & A. G. Collins, 2008. Sexually dimorphic Cubomedusa *Carybdea sivickisi* in Seto, Wakayama, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 40: 1–8.
- Lewis, C., B. Bentlage, A. A. Yanagihara, W. Gillan, J. Van Blerk, D. P. Keil, A. E. Bely, & A. G. Collins, 2013. Redescription of *Alatina alata* (Reynaud, 1830) (Cnidaria: Cubozoa) from Bonaire, Dutch Caribbean. *Zootaxa* 3737(4): 473–487.

- Lynn, J. W., 1994. The ultrastructure of the sperm and motile spermatozeugmata released from the freshwater mussel *Anodonta grandis* (Mollusca, Bivalvia, Unionidae). *Canadian Journal of Zoology* 72(8): 1452–1461.
- Mann T., 1984. Spermatophores. Development. Structure, Biochemical attributes and role in the transfer of spermatozoa. *Zoophysiology*, vol. 15. Berlin: Springer-Verlag.
- Marian, J. E. A. R., 2012. A model to explain spermatophore implantation in cephalopods (Mollusca: Cephalopoda) and a discussion on its evolutionary origins and significance. *Biological Journal of the Linnean Society* 105(4): 711–726.
- Marques, A. C., & A. G. Collins, 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123: 23–42.
- Marques, A. C., J. García, & C. Lewis Ames, 2015. Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Miller, R. L., 1976. Some observations on sexual reproduction in *Tubularia*. *Coelenterate Ecology and Behavior* 299–308.
- Miller, R. L., 1983. Cnidaria. *Reproductive Biology of Invertebrates* 2: 23–73.
- Miranda, L. S., A. G., Collins, Y. M., Hirano, C. E. Mills, & A. C. Marques, 2014. Capítulo 3. Evolution of the body plan in Staurozoa (Cnidaria): a comparative histological study. In *Evolution of Staurozoa (Cnidaria): molecular, morphological, and cnidome inferences*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Morandini, A. C., & F. L. Da Silveira, 2001. Sexual reproduction of *Nausithoe aurea* (Scyphozoa, Coronatae). Gametogenesis , egg release , embryonic development , and gastrulation. *Scientia Marina* 65(2): 139–149.
- Ó Foighil, D., 1985. Form, function, and origin of temporary dwarf males in *Pseudopythina rugifera* (Carpenter, 1864) (Bivalvia: Galeommatacea). *Veliger* 27(3): 245–252.
- Ó Foighil, D., 1989. Role of spermatozeugmata in the spawning ecology of the brooding Oyster *Ostrea edulis*. *Gamete Research* 24(2): 219–228.
- Ohtsu, K., M. Kawahara, H. Ikeda, & S. I. Uye, 2007. Experimental induction of gonadal maturation and spawning in the giant jellyfish *Nemopilema nomurai* (Scyphozoa: Rhizostomeae). *Marine Biology* 152(3): 667–676.
- Orr, T. J., & P. L. R. Brennan, 2015. Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. *Trends in Ecology & Evolution* 30(5): 261–272.
- Özbek, S., 2011. The cnidarian nematocyst: A miniature extracellular matrix within a secretory vesicle. *Protoplasma* 248(4): 635–640.
- Pearse, A. G., 1985. *Histochemistry: Theoretical and applied*, 2: Analytical technology, 4.
- Pitt, K. A., & M. J. Kingsford, 2000. Reproductive biology of the edible jellyfish *Catostylus mosaicus* (Rhizostomeae). *Marine Ecology* 137(5-6): 791-799.

- Robertson, R., 2007. Taxonomic occurrences of gastropod spermatozeugmata and non-stylommatophoran spermatophores updated. *American Malacological Bulletin* 23(1): 11–16.
- Rouse, G. W., & K. Pitt, 2000. Ultrastructure of the sperm of *Catostylus mosaicus* and *Phyllorhiza punctata* (Scyphozoa, Cnidaria): Implications for sperm terminology and the inference of reproductive mechanisms. *Invertebrate Reproduction & Development* 38(1): 23–34.
- Schiariti, A., E. Christiansen, A. C. Morandini, F. L. da Silveira, D. A. Giberto, & H. W. Mianzan, 2012. Reproductive biology of *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae): Individual traits related to sexual reproduction. *Marine Biology Research* 8: 255–264.
- Schmidt, H., & B. Hölten, 1980. Peculiarities of spermatogenesis and sperm in Anthozoa. *Development and cellular biology of Coelenterates* 53–59.
- Stewart, S., 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 175–188.
- Straehler-Pohl, I., A. Garm, & A. C. Morandini, 2014. Sexual dimorphism in Tripedaliidae (Conant 1897) (Cnidaria, Cubozoa, Carybdeida). *Zootaxa* 3785(4): 533–549.
- Studebaker, J. P., 1972. Development of the Cubomedusa, *Carybdea marsupialis*. Department Marine Science. Mayaguez, University of Puerto Rico.
- Tiemann, H., & G. Jarms, 2010. Organ-like gonads, complex oocyte formation, and long-term spawning in *Periphylla periphylla* (Cnidaria, Scyphozoa, Coronatae). *Marine Biology* 157(3): 527–535.
- Toshino, S., M. Hiroshi, S. Ohtsuka, K. Okuizumi, A. Adachi, Y. Hamatsu, M. Urata, K. Nakaguchi, & S. Yamaguchi, 2013. Development and polyp formation of the giant box jellyfish *Morbakka virulenta* (Kishinouye, 1910) (Cnidaria : Cubozoa) collected from the Seto Inland Sea , western Japan. *Plankton and Benthos Research* 8(1): 1–8.
- Toshino, S., H. Miyake, & S. Iwanaga, 2014. Development of *Copula sivickisi* (Stiasny, 1926) (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae: Tripedaliidae) collected from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Plankton and Benthos Research* 9(1): 32–41.
- Werner, B., C. E. Cutress, & J. P. Studebaker, 1971. Life cycle of *Tripedalia cystophora*, Conant (Cubomedusae). *Nature* 232: 655–657.
- Werner, B., 1973. Spermatozeugmen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Marine Biology* 18(3): 212–217.
- Widersten, B., 1965. Genital organs and fertilization some Scyphozoa. Zoological Institute, Uppsala 37: 45–61.
- Yamaguchi, M., & R. Hartwick, 1980. Early life history of the sea wasp *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). *Development and cellular biology of coelenterates* 11-16.

References

- Arneson, A. C., 1976. Life History of *Carybdea alata* Reynaud, 1830 (Cubomedusae).
- Arneson, A. C., & C. E. Cutress, 1976. Life history of *Carybdea* Reynaud, 1830 (Cubomedusae). In Mackie, G. O. (Ed.), *Coelenterate Ecology and Behavior*. New York, NY: 227–236.
- Avian, M., P. Bonivento, G. Montanari, A. Rinaldi, & L. Rottini Sandrini, 1993. *Carybdea marsupialis* L. (Cubozoa), istologia delle gonadi. *Biologia Marina, Suppl. Notiz. SIBM*, 1: 75–78.
- Behmer, O. A., E. M. C., de Tolosa, & A. G. de Freitas Neto, (1976). *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo Livraria Editora.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A. A. Yanagihara, C. Lewis, G. S. Richards, & A. G. Collins, 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 493–501.
- Bentlage, B., & C. Lewis, 2012. An illustrated key and synopsis of the families and genera of carybdeid box jellyfishes (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeida), with emphasis on the “Irukandji family” (Carukiidae). *Journal of Natural History* 46(41-42): 2595–2620.
- Bancroft, J., & A. Stevens, 1982. *Theory and practice of histological techniques*. Londres: Churchill Livingstone.
- Brinkman, D. L., X. Jia, J. Potriquet, D. Kumar, D. Dash, D. Kvaskoff, & J. Mulvenna, 2015. Transcriptome and venom proteome of the box jellyfish *Chironex fleckeri*. *BMC Genomics* 16: 1–15.
- Calder, D. R., 2009. Cubozoan and scyphozoan jellyfishes of the Carolinian biogeographic province, Southeastern USA Royal Ontario Museum. *ROM Contributions in Science*, 3: 1–58.
- Cason, J. E., 1950. A rapid one-step Mallory-Heidenhain stain for connective tissue. *Biotechnic & Histochemistry* 25(4), 225–226.
- Collins, A. G., P. Schuchert, A. C. Marques, T. Jankowski, M. Medina, & B. Schierwater, 2006. Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Systematic Biology* 55(1): 97–115.
- Corbelli, A., M. Avian, R. Marotta, & M. Ferraguti, 2003. The spermatozoon of *Carybdea marsupialis*. *Invertebrate Reproduction and Development* 43(2): 95–104.
- Cutress, C. E., 1972. Investigation of the biology and control of noxious Coelenterates occurring in the coastal waters of Puerto Rico.
- Fautin, D. G., 2002. Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology* 80(1): 1735–1754.

- Fenner, P. J., J. Lippmann, & L. a. Gershwin, 2010. Fatal and nonfatal severe jellyfish stings in Thai waters. *Journal of Travel Medicine* 17(2): 133–138.
- Garm, A., M. Lebouvier, & D. Tolunay, 2015. Mating in the box jellyfish *Copula sivickisi* -Novel function of cnidocytes. *Journal of Morphology* 276(9): 1055-1064.
- Gershwin, L. A., 2005. Taxonomy and phylogeny of Australian Cubozoa. Doctoral Dissertation, James Cook University.
- Gershwin, L. A., 2006. Comments on *Chiropsalmus* (Cnidaria: Cubozoa: Chiropodida): A preliminary revision of the Chiropsalmidae, with descriptions of two new genera and two new species. *Zootaxa* 42: 1–42.
- Hartwick, R. F., 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia* 216-217: 171–179.
- Humason, G. L., 1962. Animal tissue techniques. San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Junqueira, L. C., 1995. Histology revisited - Technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. *Ciência e Cultura* 47: 92–95.
- Lewis, C., & T. A. F. Long, 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine Biology* 147(2): 477–483.
- Lewis, C., S. Kubota, A. E. Migotto, & A. G. Collins, 2008. Sexually dimorphic Cubomedusa *Carybdea sivickisi* in Seto, Wakayama, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 40: 1–8.
- Lewis, C., B. Bentlage, A. A. Yanagihara, W. Gillan, J. Van Blerk, D. P. Keil, A. E. Bely, & A. G. Collins, 2013. Redescription of *Alatina alata* (Reynaud, 1830) (Cnidaria: Cubozoa) from Bonaire, Dutch Caribbean. *Zootaxa* 3737(4): 473–487.
- Marques, A. C., & A. G. Collins, 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123: 23–42.
- Marques, A. C., J. García, & C. Lewis Ames, 2015. Internal fertilization and sperm storage in cnidarians: a response to Orr and Brennan. *Trends in Ecology & Evolution*.
- Mendoza-Becerril M. A., J. E. A. R. Marian, A. E. Migotto & A. C. Marques, 2015. Capítulo 3: Exoskeletal system of Bougainvilliidae and other Hydrozoa (Cnidaria, Hydrozoa). In: Padrões de diversificação de Bougainvilliidae no contexto evolutivo de Medusozoa (Cnidaria). Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Orr, T. J., & P. L. Brennan, 2015. Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. *Trends in ecology & evolution*, 30(5): 261-272.
- Pearse, A. G., 1985. Histochemistry: Theoretical and applied, 2: Analytical technology, 4.
- Stewart, S., 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 175–188.

- Straehler-Pohl, I., A. Garm, & A. C. Morandini, 2014. Sexual dimorphism in Tripedaliidae (Conant 1897) (Cnidaria, Cubozoa, Carybdeida). *Zootaxa* 3785(4): 533–549.
- Studebaker, J. P., 1972. Development of the Cubomedusa, *Carybdea marsupialis*. Department Marine Science. Mayaguez, University of Puerto Rico.
- Toshino, S., M. Hiroshi, S. Ohtsuka, K. Okuizumi, A. Adachi, Y. Hamatsu, M. Urata, K. Nakaguchi, & S. Yamaguchi, 2013. Development and polyp formation of the giant box jellyfish *Morbakka virulenta* (Kishinouye, 1910) (Cnidaria : Cubozoa) collected from the Seto Inland Sea , western Japan. *Plankton and Benthos Research* 8(1): 1–8.
- Toshino, S., H. Miyake, & S. Iwanaga, 2014. Development of *Copula sivickisi* (Stiasny, 1926) (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae: Tripedaliidae) collected from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Plankton and Benthos Research* 9(1): 32–41.
- Uchida, T., 1970. Revision of Japanese Cubomedusae. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 17: 289–297.
- Van Iten, H., A. C. Marques, J. D. M. Leme, M. L. a F. Pacheco, & M. G. Simões, 2014. Origin and early diversification of the phylum Cnidaria Verrill: Major developments in the analysis of the taxon's proterozoic-cambrian history. *Palaeontology* 57(4): 677–690.
- Werner, B., C. E. Cutress, & J. P. Studebaker, 1971. Life cycle of *Tripedalia cystophora*, Conant (Cubomedusae). *Nature* 232: 655–657.
- Werner, B., 1973. Spermatozeugmen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Marine Biology* 18(3): 212–217.
- Yamaguchi, M., & R. Hartwick, 1980. Early life history of the sea wasp *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). *Development and cellular biology of coelenterates* 11-16.

in Orr & Brennan, 2015). It is clear that selective pressures to attain highly specialized internal fertilization (and corresponding sperm storage structures) resulted in several different and sometimes homoplastic strategies in animals. However, we believe that it is important to emphasize that in the case of tripedalid box jellyfish, selective pressures must have acted on both males and females (i.e., coevolution between the sexes in relation to sperm storage) to enhance fertilization efficiency. This is best put into perspective when recognizing that these morphologically rather simple basal animals inhabit the planktonic realm – a habitat in which organisms are driven by the currents, and, by definition, have incipient or no swimming capacity, drifting almost randomly with little control over mate choice. To increase our understanding of the evolutionary diversity of sperm storage adaptations, we must examine sexual selection in male and female medusozoans from a combined ecological, phylogenetic, and physiological perspective.

References

- Arneson, A. C., & C. E. Cutress, 1976. Life history of *Carybdea* Reynaud, 1830 (Cubomedusae). In Mackie, G. O. (Ed.), *Coelenterate Ecology and Behavior*. New York, NY: 227–236.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A. A. Yanagihara, C. Lewis, G. S. Richards, & A. G. Collins, 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 493–501.
- Cartwright, P., & A. M. Nawrocki, 2010. Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integrative and comparative biology* 50(3): 456–472.
- Hartwick, R. F., 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia* 216-217: 171–179.
- Lewis, C., & T. A. F. Long, 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine Biology* 147(2): 477–483.
- Marques, A. C., & A. G. Collins, 2004. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarian evolution. *Invertebrate Biology* 123: 23–42.
- Orr, T. J., & P. L. R. Brennan, 2015. Sperm storage: distinguishing selective processes and evaluating criteria. *Trends in Ecology & Evolution* 30(5): 261–272.
- Schiariti, A., E. Christiansen, A. C. Morandini, F. L. da Silveira, D. A. Giberto, & H. W. Mianzan, 2012. Reproductive biology of *Lychnorhiza lucerna* (Cnidaria: Scyphozoa: Rhizostomeae): Individual traits related to sexual reproduction. *Marine Biology Research* 8: 255–264.
- Stewart, S., 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 175–188.

Werner, B., 1973. Spermatozeugmen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Marine Biology* 18(3): 212–217.

Yamaguchi, M., & R. Hartwick, 1980. Early life history of the sea wasp *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). *Development and cellular biology of coelenterates*. Amsterdam 11-16.

CAPÍTULO 5.

Considerações Finais

O estudo da classe Cubozoa (Cnidaria) apresenta várias dificuldades, como a descrição inadequada da maioria das espécies, o fato de serem raramente coletadas, a dificuldade de cultivo em laboratório, pouco conhecimento sobre sua reprodução. O comportamento reprodutivo é documentado apenas em algumas espécies, nomeadamente *Alatina alata* (Arneson & Cutress, 1976; Lewis *et al.*, 2013), *Carybdea marsupialis* (Stuedebaker, 1972; Corbelli *et al.*, 2003), *Chironex fleckeri* (Yamaguchi & Hartwick, 1980), *Chiropsella bronzie* (como *Chiropsalmus quadrigatus* em Yamaguchi & Hartwick, 1980), *Copula sivickisi* (Hartwick, 1991; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Toshino *et al.*, 2014; Garm *et al.*, 2015), *Morbakka virulenta* (Toshino *et al.*, 2013) e *Tripedalia cystophora* (Werner *et al.*, 1971; Werner, 1973; Stewart, 1996). A fertilização em Cubozoa é tanto interna como externa, como ocorre no grupo de espécies que analisamos.

A morfologia das gônadas masculinas de diferentes espécies (*Alatina alata*, *Carybdea marsupialis*, *Chiropsalmus quadrumanus*, *Copula sivickisi*, *Morbakka virulenta* e *Tamoya haplonema*) e seus diferentes modos de reprodução permitiu-nos inferir se há um padrão geral correspondente ao modo de reprodução e se a organização histológica está relacionada com a filogenia. Além disso, descrevemos pela primeira vez a espermatogênese em Cubozoa, em diferentes estágios de desenvolvimento. Suas gônadas estão formadas por duas camadas, um epitélio gonadal (ou gastroderme) e a mesogleia gonadal, onde a espermatogênese ocorre dentro dos folículos espermáticos. Os resultados histológicos também permitem concluir que não há diferenças histo-morfológicas entre espécies com diferentes modos de reprodução, como observado em *M. virulenta* e *C. quadrumanus* (fertilização externa) e *C. marsupialis* (interna).

Outra conclusão importante é que a organização histológica nas gônadas masculinas não possui correlação funcional (modos de reprodução) ou evolutiva (na filogenia), ou seja, o padrão histológico observado é idêntico em espécies filogeneticamente distantes e com diferentes modos de reprodução, como em *C. marsupialis* (Carybdeida: Carybdeidae) e *C. quadrumanus* (Chirodropida: Chiropsalmidae). Por outro lado, espécies próximas e com mesmo tipo de fertilização (interna), como *C. marsupialis* (Carybdeida: Carybdeidae) e *C. sivickisi* (Carybdeida: Tripedaliidae), apresentam diferenças na histologia de suas gônadas.

Encontramos também diferenças entre espécies com fertilização interna que produzem espermatóforo (*C. sivickisi*) ou espermatozógonas (*A. alata*). A terminologia dessas estruturas pós-espermáticas de Tripedaliidae é confusa, e ambos os termos eram encontrados para uma mesma estrutura. Assim, definimos espermatóforo como pacotes de esperma encapsulados, e espermatozógonas como pacotes de esperma sem cápsula e com as caudas dos espermatozógonas móveis. Estudos futuros sobre outras espécies de Cubozoa com reprodução conhecida, bem como estudos relacionados às fêmeas serão relevantes para testar algumas hipóteses e melhorar o conhecimento da histo-morfologia e modos reprodutivos.

Nosso estudo também permitiu redefinir diferentes estruturas que participam da reprodução em *C. sivickisi*. Seus sacos subgástricos, anteriormente definidos como estruturas de armazenamento do espermatozógonas (espermateca em fêmeas e vesícula seminal em machos; Werner, 1976; Hartwick, 1991; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008; Straehler-Pohl, 2011; Straehler-Pohl *et al.*, 2014) não possuem, de fato, espermatógonas em seu interior. Entretanto, essas estruturas apresentam nematoblastos e nematocistos euritelos e podem funcionar como “ninhos de nematocistos” (“nematocyst nests”), com esses nematocistos podendo migrar para outros locais. Os sacos subgástricos são únicos em tripedalídeos (como em *Tripedalia cystophora*; Werner, 1976; Straehler-Pohl *et al.*, 2014) e poderiam participar na inclusão de nematocistos no “embryo strand” e espermatógonas, assim como na digestão, já que encontramos euritelos também nos cirros gástricos. Verificamos também que há espermatógonas no interior das manchas velariais (“velarial spots”) presentes em fêmeas adultas de *C. sivickisi* (Hartwick, 1991; Lewis & Long, 2005; Lewis *et al.*, 2008), que funcionariam como estruturas de armazenamento do esperma (espermateca), em vez dos sacos subgástricos.

Referências

- Arneson, A. C., & C. E. Cutress, 1976. Life History of *Carybdea alata* Reynaud, 1830 (Cubomedusae). *Coelenterate Ecology and Behavior*. Springer US, 227–236.
- Bentlage, B., P. Cartwright, A. A. Yanagihara, C. Lewis, G. S. Richards, & A. G. Collins, 2010. Evolution of box jellyfish (Cnidaria: Cubozoa), a group of highly toxic invertebrates. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 277: 493–501.
- Corbelli, A., M. Avian, R. Marotta, & M. Ferraguti, 2003. The spermatozoon of *Carybdea marsupialis*. *Invertebrate Reproduction and Development* 43(2): 95–104.

- Garm, A., M. Lebouvier, & D. Tolunay, 2015. Mating in the box jellyfish *Copula sivickisi* -Novel function of cnidocytes. *Journal of Morphology* 276(9): 1055-1064.
- Hartwick, R. F., 1991. Observations on the anatomy, behaviour, reproduction and life cycle of the cubozoan *Carybdea sivickisi*. *Hydrobiologia* 216-217: 171-179.
- Lewis, C., & T. A. F. Long, 2005. Courtship and reproduction in *Carybdea sivickisi* (Cnidaria: Cubozoa). *Marine Biology* 147(2): 477-483.
- Lewis, C., S. Kubota, A. E. Migotto, & A. G. Collins, 2008. Sexually dimorphic Cubomedusa *Carybdea sivickisi* in Seto, Wakayama, Japan. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory* 40: 1-8.
- Lewis, C., B. Bentlage, A. A. Yanagihara, W. Gillan, J. Van Blerk, D. P. Keil, A. E. Bely, & A. G. Collins, 2013. Redescription of *Alatina alata* (Reynaud, 1830) (Cnidaria: Cubozoa) from Bonaire, Dutch Caribbean. *Zootaxa* 3737(4): 473-487.
- Stewart, S., 1996. Field behavior of *Tripedalia cystophora* (class Cubozoa). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 27(2-3): 175-188.
- Straehler-Pohl, I., 2011. Biology of the box jellyfish *Carybdea sivickisi* at Akajima. *Midoriishi*, 22, 8-13. [in Japanese]
- Straehler-Pohl, I., A. Garm, & A. C. Morandini, 2014. Sexual dimorphism in Tripedaliidae (Conant 1897) (Cnidaria, Cubozoa, Carybdeida). *Zootaxa* 3785(4): 533-549.
- Studebaker, J. P., 1972. Development of the Cubomedusa, *Carybdea marsupialis*. Department Marine Science. Mayaguez, University of Puerto Rico.
- Toshino, S., M. Hiroshi, S. Ohtsuka, K. Okuizumi, A. Adachi, Y. Hamatsu, M. Urata, K. Nakaguchi, & S. Yamaguchi, 2013. Development and polyp formation of the giant box jellyfish *Morbakka virulenta* (Kishinouye, 1910) (Cnidaria : Cubozoa) collected from the Seto Inland Sea , western Japan. *Plankton and Benthos Research* 8(1): 1-8.
- Toshino, S., H. Miyake, & S. Iwanaga, 2014. Development of *Copula sivickisi* (Stiasny, 1926) (Cnidaria: Cubozoa: Carybdeidae: Tripedaliidae) collected from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Plankton and Benthos Research* 9(1): 32-41.
- Werner, B., C. E. Cutress, & J. P. Studebaker, 1971. Life cycle of *Tripedalia cystophora*, Conant (Cubomedusae). *Nature* 232: 655-657.
- Werner, B., 1973. Spermatozeugmen und Paarungsverhalten bei *Tripedalia cystophora* (Cubomedusae). *Marine Biology* 18(3): 212-217.
- Werner, B., 1976. Killermedusen und ihr Liebesspiel. *Umschau*, 76 (3), 80-81.
- Yamaguchi, M., & R. Hartwick, 1980. Early life history of the sea wasp *Chironex fleckeri* (Class Cubozoa). *Development and cellular biology of coelenterates* 11-16.

Resumo

Esse estudo levanta dados sobre a reprodução em Cubozoa por meio de análises histomorfológicas. Nossos objetivos foram (1) estabelecer um padrão geral na morfologia das gônadas masculinas em relação ao tipo de fertilização; (2) estabelecer relações entre a diversidade de modos de reprodução e as morfologias associadas com a filogenia do grupo; (3) definir estruturas pós-espermáticas (espermatóforo e espermatózeugma) para Cubozoa Carybdeida; (4) investigar a existência de novas estruturas de armazenamento de esperma em Tripedaliidae. Para tal, estudamos seis espécies de famílias diferentes, cinco da ordem Carybdeida (*Alatina alata*, *Carybdea marsupialis*, *Copula sivickisi*, *Morbakka virulenta* e *Tamoya haplonema*) e uma Chirodropida (*Chiropsalmus quadrumanus*), com diferentes tipos de reprodução (fertilização externa ou interna). Nossos resultados demonstram que a organização histológica das gônadas masculinas não tem uma correlação funcional com modos de reprodução, nem é evolutiva com propostas filogenéticas. Somos o primeiro estudo a descrever a espermatogênese em Cubozoa, e modo de liberação dos espermatozoides, podendo ser liberados individualmente por meio de diferentes pontos de ruptura na gônada (no caso de *Tamoya cf. haplonema*) ou mediante a formação de pacotes de esperma: encapsulados (= espermatóforo em *C. sivickisi*) ou não capsulados (= espermatózeugma em *A. alata*). Propomos uma revisão da terminologia das estruturas pós-espermáticas (pacotes de esperma, a saber, espermatóforo e espermatózeugmata), quem vêm sendo indistintamente utilizadas em estudos em Tripedaliidae. Também definimos estruturas de armazenamento de esperma nas fêmeas de *C. sivickisi* ainda desconhecidas, como manchas velariais (“velarial spots”), reportando espermatozoides em seu interior, mas descartando que sacos subgástricos possuam esta função. No entanto, resultados histológicos mostram que há nematoblastos e nematocistos euritelos no interior desses sacos subgástricos (estruturas particulares de Tripedaliidae), podendo colaborar na inclusão desses nematocistos na cadeia de embriões (“embryo strand”) no caso das fêmeas, e no espermatóforo no caso dos machos, participando assim na reprodução em Cubozoa.

Abstract

This study raises data on reproduction in Cubozoa through histo-morphological analysis. Our objectives were to (1) determine a general pattern in the morphology of male gonads in relation to the mode of fertilization; (2) establish relationships between the diversity of reproduction modes and morphologies associated with the phylogeny of the group; (3) define post-spermatocytic structures (spermatophore and espermatocytogama) to Cubozoa Carybdeida; (4) investigate the existence of new sperm storage structures in Tripedaliidae. To accomplish that, we studied six species of different families, five from Carybdeida (*Alatina alata*, *Carybdea marsupialis*, *Copula sivickisi*, *Morbakka virulenta* e *Tamoya haplonema*) and one Chirodropida (*Chiropsalmus quadrumanus*) with different types of reproduction (internal or external fertilization). Our results demonstrate that the histological organization of male gonads do not have a functional correlation with reproduction modes or with phylogenetic and evolutionary trends. We are the first study to describe the spermatogenesis in Cubozoa and the mode of release of sperm, which can be released individually by different rupture sites in gonadal tissue (as in *Tamoya cf. haplonema*) or by formation of sperm packages: encapsulated (= spermatophore in *C. sivickisi*) or not encapsulated (= spermatocytogama in *A. alata*). We propose a review of terminology of post-sperm structures (sperm packages, namely spermatophore and espermatocytogamata), that have been used interchangeably in studies of Tripedaliidae. We also defined still unknown sperm storage structures in the *C. sivickisi* females, as velarial spots, reporting sperm inside it, and discarding that subgastric sacs have this function. However, histological findings show that there are nematoblasts and euryteles nematocysts within these subgastric sacs (unique structures of Tripedaliidae) and may collaborate on the inclusion of these nematocysts in the embryo strand, in females, and spermatophore, in males, thus participating in the reproduction of Cubozoa.